

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

Ac

(11)Publication number : 2002-306163

(43)Date of publication of application : 22.10.2002

(51)Int.Cl.

C12N 9/74  
// C12N 1/21  
C12N 15/09  
(C12N 1/21  
C12R 1:19 )

(21)Application number : 2001-113253

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES INST

(22)Date of filing : 11.04.2001

(72)Inventor : SOEJIMA KENJI  
YONEMURA HIROSHI  
NAKATAKE HIROSHI  
IMAMURA TAKAYUKI  
NOZAKI CHIKAHIDE

(54) METHOD OF PREPARING GENE-RECOMBINANT HUMAN THROMBIN USING ESCHERICHIA COIL AS HOST

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of preparing gene-recombinant human thrombin by use of Escherichia coli as a host and improve the efficiency of the steps of the recovery of the inclusion bodies of human prothrombin as an expression product of Escherichia coli, the solubilization thereof and the rewinding. SOLUTION: The steps of the inclusion body recovery, the solubilization of the inclusion body and the rewinding are carried out by the following operations: (1) the inclusion bodies are dispersed in the solubilization buffer; (2) the solubilization by crushing with ultrasonic wave or physical shearing force; and (3) dilution into refolding buffer solution. Desired recombinant thrombin preparation is given that can substitute the conventional thrombin preparations originating from bovine blood or human plasma.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-306163

(P2002-306163A)

(43) 公開日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 9/74		C 1 2 N 9/74	4 B 0 2 4
// C 1 2 N 1/21		1/21	4 B 0 5 0
15/09	Z N A	C 1 2 R 1: 19	4 B 0 6 5
(C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1: 19)			
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-113253(P2001-113253)

(22) 出願日 平成13年4月11日 (2001. 4. 11)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年10月12日  
社団法人日本生化学会開催の「第73回日本生化学会大会」において文書をもって発表

(71) 出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所  
熊本県熊本市大塚一丁目6番1号

(72) 発明者 副島 見事

熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1  
財団法人化学及血清療法研究所 菊池研  
究所内

(72) 発明者 米村 宏

熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1  
財団法人化学及血清療法研究所 菊池研  
究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸菌を宿主とする遺伝子組換えヒトトロンビンの調製方法

(57) 【要約】

【目的】 大腸菌を宿主とする遺伝子組換えヒトトロンビンの調製方法を提供し、大腸菌の発現産物であるヒトプレトロンビンの封入体の回収、可溶化そしてまき直し工程の効率化をめざす。

【構成】 前記封入体の回収、可溶化及びそれに引き続くまき直しの工程が、1) 封入体の可溶化バッファーへの懸濁、2) 超音波または物理的せん断力を利用した破碎処理による可溶化、3) リフォールディングバッファーへの希釈より構成される。

【効果】 従来のウシ血液またはヒト血漿に由来するトロンビン製剤に代替し得る所望の組換えトロンビン製剤をもたらす。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 遺伝子組換え技術によって形質転換されたヒトプレトロンピンを産生する大腸菌を培養し、形成されたヒトプレトロンピンを含有する封入体を回収し、可溶化後、まき直し（以下、リフォールディングともいう）を経る工程を含む遺伝子組換えヒトロンピンの調製方法において、前記封入体の回収、可溶化及びそれに引き続くまき直しの工程が、1) 封入体の可溶化バッファーへの懸濁、2) 超音波または物理的せん断力を利用した破碎処理による可溶化、3) リフォールディングバッファーへの希釈より構成されることを特徴とする、遺伝子組換えヒトロンピンの調製方法。

【請求項2】 封入体の可溶化バッファーが、1.0mM～100mM好ましくは1.0mM～50mMのシステイン、グルタチオン(GSH)、ジチオスレイトール(DTT)及び2-メルカプトエタノール(2ME)より選択される還元剤並びに4M～8Mの尿素もしくは2M～6Mのグアニジン塩酸塩の変性剤を含有し、pH7～11であることを特徴とする、請求項1記載の遺伝子組換えヒトロンピンの調製方法。

【請求項3】 リフォールディングバッファーが、0.3M以上好ましくは0.5M以上のアルギニン、0.3M以上好ましくは0.5M以上の塩化ナトリウム、1%～5%好ましくは5%～20%のグリセロール及び0.01%以上の非イオン性界面活性剤を含有することを特徴とする、請求項1または請求項2記載の遺伝子組換えヒトロンピンの調製方法。

【請求項4】 0.3M以上好ましくは0.5M以上のアルギニン、0.3M以上好ましくは0.5M以上の塩化ナトリウム、1%～5%好ましくは5%～20%のグリセロール及び0.01%以上の非イオン性界面活性剤を含有するリフォールディングバッファーを用いて希釈することを特徴とする、大腸菌由来ヒトプレトロンピンのリフォールディング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本願発明は、医療用医薬品の分野に係る血漿蛋白質に関する。詳細には、遺伝子組換え技術を利用したロンピンの調製方法に関し、さらに詳細には、形質転換大腸菌より発現されるヒトプレトロンピンの封入体（インクルージョンボディ）からの効率的な回収及びまき直し工程を含むヒトロンピンの調製方法に関する。

## 【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】

【0002】 トロンピンは、トリプシンファミリーに属する凝固因子群の一つで、様々な基質と相互作用し、凝固(procoagulant)、抗凝固(anticoagulant)的に作用する多様な機能を有するセリンプロテアーゼである。凝固の場合は、最終的にトロンピンがフィブリノーゲンを限定分解し（その際フィブリノーゲンA $\alpha$ 、B $\beta$ 鎖中のA

2

r g-G l y間の結合を切断し、フィブリノペプチド(fibrinopeptide) A及びBを遊離する)、これにより、フィブリンモノマーはポリマー化し、さらに、トロンピンによって活性化されたトランスグルタミナーゼ(trasglutaminase)である血液凝固第XIII因子によって架橋され、ポリマー化したフィブリン凝塊は安定化される。また、トロンピンはこの他に、血液凝固第V因子、VII因子、XI因子をフィードバック的に活性化する。さらに、トロンピンは、血管内皮細胞表面蛋白質(endothelial cell surface protein)であるトロンボモジュリン(thrombomodulin)と複合体を形成することで、thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor(TAFI)あるいは、抗凝固性のプロテインC(protein C)を活性化する。そして、さらには血小板上のトロンビンレセプターを活性化することで、血小板凝集を惹き起こすことが知られている。このトロンビン活性は、アンチトロンビン(antithrombin) III、ヘパリンコファクター(heparin cofactor) IIなどのいくつかのセリンプロテアーゼインヒビターによって、制御されている。

【0003】 ヒトロンピンは、生体内では、もともと579アミノ酸残基からなるビタミンK依存性の一本鎖糖蛋白質であるプロトロンピンとして存在する。このプロトロンピンは、Asn78, 100, 373にN-link糖鎖を有し、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン(領域)、二つのクリングルドメインおよびプロテアーゼドメイン(領域)からなる分子量72,000のセリンプロテアーゼ前駆体で、主に肝臓で合成され血液中に分泌される。血液凝固カスケードが作動するとプロトロンピンはプロトロンビナーゼ(血液凝固Xa因子、Va因子、リン脂質及びCa<sup>2+</sup>からなる複合体)により、Arg271-Thr272およびArg320-Ile321の二カ所が限定分解され、最終的に一本のジスルフィド結合でつながった308アミノ酸残基からなる二本鎖(Thr272からArg320までの49アミノ酸残基からなるA鎖と、Ile321からGlu579までの259アミノ酸残基からなるB鎖)の $\alpha$ トロンピンを生成する。

【0004】 上述の多様な機能を有するトロンピンは医薬品として製剤化され、止血剤、そして生体組織接着剤のコンポーネントとして広く用いられている。 $\alpha$ トロンピン製剤は、現在は、そのコストの安価さなどからウシ血漿由来のものが通常経口医薬品として用いられているが、アナフィラキシーの問題などが報告されている。また、ヒト血漿由来のものもあるが、病原性の夾雑ウイルスの問題等その安全性においては、格段の対処を必要とする。一方で安価で安定的に遺伝子組換え品が調製できることが望まれている。

【0005】 プレトロンピンは、プロトロンピンのGla領域及びクリングル1(K1)領域が欠失した分子形態を言い、その中の1分子態様であるプレトロンピン-2

50

3

は、プロトロンビンの最初のArg271-Thr272のみが切断された一本鎖のA、B鎖に相当するもので、一カ所の糖鎖付加サイト(Asn373)と分子内に合計4組のジスルフィド結合を持つ(A鎖とB鎖をつなぐCys293-Cys439、B鎖内のCys348-Cys364、Cys493-Cys507及びCys521-Cys551)。一カ所の付加された糖鎖は、生物活性には大きな影響を及ぼさないことが大腸菌を宿主としたウシ由来トロンビンで報告されている(DiBelliaら、J. Biol. Chem. 270:163-169(1995))。従って、上記知見より、大腸菌を宿主として簡便に安価に、ヒトαトロンビンの前駆物質としてのヒトプレトロンビンを調製することができれば、有用なヒトαトロンビン製剤を供し得ることが期待される。

【0006】しかし、大腸菌を宿主として外来性の遺伝子産物を大量に発現させた場合、インクルージョンボディ(封入体)を形成することが多く、リフォールディング(まき直し)が重要なステップとなる。大腸菌で発現させたヒトプレトロンビンのリフォールディングは困難であることが報告されており、(Choiら、korean Biochem. J. 22:154-160(1989)、Soら、korean Biochem. J. 25:60-65(1992))、得られた蛋白質の性状解析まで実施された報告はない。通常、蛋白質を還元後リフォールディングする際には、ジスルフィド結合の数が多ければ多いほど、ジスルフィド結合が再形成される確率は低くなる。プレトロンビンのリフォールディングに関しては、今までウシプレトロンビン-2に関して、スルホ化を利用した報告があるのみであるが(DiBelliaら、J. Biol. Chem. 270:163-169(1995))、本願発明者が当該報告に準じてヒトプレトロンビン-2のリフォールディングを試みたところ、理由はなお不明であるが、効率は低かった。そこでこのスルホ化によるまき直しを経ずに、簡便に効率良くまき直しのできる方法を追求することを本願発明の技術的課題とした。

【0007】

PT 1	5'-ATGGCGCACGTCGAGGCTTGCAGCTGCCT-3'
PT 2	5'-CTACTCTCCAAACTGATCAATGACCTTCT-3'
PT 3	5'-ATGCCCATGGCCACAAGTGAGTAC-3'
PT 4	5'-TAGCATAAGCTTCTACTCTCCAAACTGATCAAT-3'

【0011】集菌した大腸菌ペレットを蒸留水にて再懸濁し、リゾチームを添加して静置後菌体を破砕する。そして、さらに超音波処理後、遠心機にて遠心分離しペレットを回収し、これをバッファー、(例えば50mMトリリス、10mMEDTA、1%トリトンX-100、pH8.0)にて再懸濁する。遠心分離、超音波処理、再懸

4

【問題を解決するための手段、発明の構成】本願発明の組換え産物の対象物質としての組換えプレトロンビンは、封入体内で強く凝集しており、その殆どが不活性でアンフォールドな状態と考えられた。一般に、封入体を可溶化して活性をもった蛋白質を得るには、リフォールディングプロセスが必要になる。しかし、このプロセスにおいては、天然状態への巻戻りと競合して分子間の重合が起こる。従って、効率の良いリフォールディングを行うには、分子間凝集を抑制し、分子内の巻戻りを優先させるための条件検討が必要で、この条件は対象たる蛋白質毎に異なる。そのため、可溶化・リフォールディングの最適な条件決定までには様々な試行錯誤を要する。

【0008】本願発明者等は、上記課題を達成するため鋭意研究した結果、封入体の可溶化からリフォールディングまでの工程に関し、1)封入体の可溶化バッファーへの懸濁、2)超音波処理による可溶化、3)リフォールディングバッファーへの希釈を基本構成とする簡便且つ効率的な方法を見出し、本願発明を完成するに至った。

【0009】本願発明においては、蛋白質の発現効率等を考慮し、大腸菌を宿主としてプレトロンビン、中でも好適な実施態様としてプレトロンビン-2を発現させ、宿主細胞の培養、前記封入体の回収、可溶化、リフォールディングを経て回収されるプレトロンビンをエカリン等の活性化剤によって活性化させ、所望のヒトトロンビンを調製する態様を採る。以下、その概要を記す。

【0010】プレトロンビンを産生する組換え形質転換大腸菌の作製は、今や常法と化した遺伝子組換え技術を適用し得る。即ち、ヒト肝臓より例えば、配列表及び表1(プラスミド構築に用いたプライマー)に記載の既知のプライマーを用いたPCRを実施してプロトロンビン遺伝子を単離し、さらにプレトロンビン遺伝子を増幅させる。増幅されたプレトロンビン遺伝子を好適なプロモーターを有する発現プラスミドに挿入し、当該発現プラスミドを宿主大腸菌、例えばJM109に導入し、ヒトプレトロンビンを発現し得る形質転換体を作製する。形質転換された前記大腸菌を培養し、培養後4℃の条件下、遠心機にて集菌する。

【表1】

濁操作を数回繰り返したのち、ペレットを蒸留水にて再懸濁し、同様に遠心分離、超音波処理、再懸濁操作を数回繰り返す、インクルージョンボディを回収する。回収されたインクルージョンボディは、可溶化バッファーによって可溶化される。可溶化バッファーは、10mM～100mM好ましくは10mM～50mMのシステイ

5

ン、グルタチオン(GSH)、チオスレイトール(DT)及び2-メルカプトエタノール(2ME)より選択される還元剤並びに4M~8Mの尿素もしくは2M~6Mのグアニジン塩酸塩の変性剤を含有し、pH7~11である。好適には、23mM 酢酸アンモニウム、8M 尿素(もしくは6Mグアニジン塩酸塩)、1.0mM EDTA、及び30mM シスチン、pH9.5の組成が例示される。当該可溶化バッファーにインクルージョンボディー重量10mg/ml(蛋白含量でおおよそ2mg/ml)となるように再懸濁後、超音波処理またはポリトロンで例示される物理的せん断力を利用した破碎処理を行い、室温にて振とうする。

【0012】その後、遠心処理し、上清を0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターにて濾過する。そして、濾液を含有蛋白質終濃度50~100 $\mu$ g/mlとなるように、徐々にリフォールディングバッファーへ攪拌しながら希釈する。ここで、本願発明のリフォールディングバッファーは、0.3M以上好ましくは0.5M以上のアルギニン、0.3M以上好ましくは0.5M以上の塩化ナトリウム、1%~5%好ましくは5%~20%のグリセロール及び0.01%以上の非イオン性界面活性剤を含有することを特徴とし、好適な例として、50mMトリス、20mM塩化カルシウム、500mM塩化ナトリウム、1mM EDTA、600mMアルギニン、1mM シスチン、0.1mMシスチン、10%グリセロールおよび0.2%Brij-58、pH8.5が推奨される。なお、非イオン性界面活性剤として、Tween系、Brij系及びトリトン(Triton)系のもの等が使用され得る。また、本願発明のリフォールディングバッファーを使用する限り、まき直しの希釈操作における温度は特段留意する必要はない。即ち、4℃あるいは室温下のいずれにおいても好ましい結果を得ることができる。希釈終了からさらに一晩で攪拌し、まき直しを進行させる。

【0013】まき直しが完了した溶液より、透析により変性剤を除去し、その後イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の手段により所望のヒトプレトロンピンを精製する。精製されたヒトプレトロンピンは好適な活性剤、例えば蛇毒エカリン等によりトロンピンに変換され、その後、アフィニティークロマトグラフィー等の手段により精製ヒトトロンピンとして得ることができる。

#### 【発明の効果】

【0014】本願発明の、とりわけ大腸菌によって発現されるプレトロンピンのリフォールディング工程に特長を有する大腸菌を宿主とした遺伝子組換えヒトトロンピンの作製方法は、リフォールディング効率4~5%、精製後最終収率0.5~1%(大腸菌培養1リットル当たり0.5~1mgに相当)であり、従来報告されたトロンピンのリフォールディング法を含む方法に比較して、収率

6

において同等以上であり、簡便さの点で従来法をはるかに凌駕するものであった。また、本願発明に基づいて調製された組換えトロンピンの物理化学的性状は、プラズマ由来のものに比較して糖鎖付加の有無を除き同等であり、酵素学的性状についても種々の基質に対して同等であった。かくして、本願発明によって、従来のウシ血液またはヒト血漿に由来するトロンピン製剤に代替し得る所望の組換えトロンピン製剤をもたらすことができる。

【0015】以下に、実施例を用いて本願発明を詳説するが、本願発明は当該実施例に何等限定されるものではない。

#### 【0016】

##### 【実施例】実施例1

(プラスミドの構築と形質転換大腸菌の作製)以下に記載の遺伝子組換え技術の一般的方法はMolecular Cloning(Cold Spring Harbor Press)に従った。人肝臓RNAよりPT1とPT2プライマーを用いてRT-PCRによりプロトロンピン遺伝子を単離した。そのPCR断片からさらにPT3とPT4プライマーを用いてプレトロンピン遺伝子を増幅させ、制限酵素NcoIとHindIIIにより消化した。発現プラスミドはpUC18(宝酒造)の複製開始点を含む領域をpKK233-2(ファルマシア)に導入しpUT1を構築した。pUC18のPvuIIサイトにEcoRIリンカーによりEcoRI部位を導入した。そのプラスミドからEcoRI/PvuI断片を単離し、pKK233-2のEcoRI/PvuI部位に挿入し、pUT1を構築した。その発現プラスミドpUT1のptrcプロモーター下流のクローニングサイト(NcoI, HindIII部位)にNcoIとHindIII部位を両端に持つプレトロンピン-2遺伝子断片を挿入しpUTBを構築した。上記、プラスミドの構築に係る一連の流れを図1に示した。そのプラスミドpUTBを大腸菌JM109に導入し、ヒトプレトロンピンを発現し得る形質転換体を作製した。

##### 【0017】大腸菌の培養

ヒトプレトロンピン-2の遺伝子を含む発現プラスミドを導入した宿主大腸菌を50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地200ml中に30℃で一晩前培養し、それを8リットルのLB培地を含むファーメンターに播種し、600nmの濁度が0.2~0.5になるまで30℃にて培養した。その後、終濃度1mMとなるようにイソプロピルー1-チオ $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを添加して、さらに一晩培養し、ヒトプレトロンピン-2の発現を誘導した。そして、培養した大腸菌を30分4℃の条件下、遠心機にて集菌した。

##### 【0018】実施例2

(インクルージョンボディーの回収、可溶化及びそれからのまき直し)集菌した大腸菌ペレットを蒸留水にて再懸濁し、終濃度0.6mg/mlのリゾチームを添加し

7

て、室温下30分撹拌後、一晚4℃に静置し、菌体を破碎した。そして、さらに超音波処理後、遠心機にて(20分4℃)遠心分離しペレットを回収し、これをバッファー(50mMトリス、10mMEDTA、1% トリトンX-100、pH8.0)にて再懸濁した。この遠心分離、超音波処理、再懸濁操作を数回繰り返したのち、ペレットを蒸留水に再懸濁し、同様に遠心分離、超音波処理、再懸濁操作を数回繰り返し、インクルージョンボディを回収した。

【0019】インクルージョンボディは、バッファー(23mM 酢酸アンモニウム、8M尿素(もしくは6M グアニジン塩酸塩)、10mM EDTA、及び30mM シス테인、pH9.5)にインクルージョンボディ重量10mg/ml(蛋白含量でおよそ2mg/ml)となるように再懸濁後、超音波処理して、室温にて2時間振とうした。その後、10,000×gにて10分間遠心し、上清を0.45μmのメンブレンフィルターにて濾過した。そして、濾液を含有蛋白質終濃度50~100μg/mlとなるように、徐々にバッファー(50mMトリス、20mM塩化カルシウム、500mM塩化ナトリウム、1mM EDTA、600mMアルギニン、1mMシス테인、0.1mMシスチン、10%グリセロールおよび0.2%Brj-58、pH8.5)へ撹拌しながら室温で希釈した。希釈終了からさらに一晚室温で撹拌し、まき直しを進行させた。

#### 【0020】実施例3

##### まき直し蛋白質の精製

まき直した溶液は20mMクエン酸バッファー(pH5.5)に対して、4℃で1~2日透析し、変性剤を除去した。この時生じた沈殿を0.45μmメンブレンフィルターで濾過し、除去後、濾液をSP-セファロース陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。その後、0~1Mの塩化ナトリウムを含む20mMクエン酸バッファーの直線的な勾配により溶出し、活性のある画分を集めた。引き続き、集めた画分を透析もしくは希釈等により、塩濃度を生理的条件に近いレベルまで下げ、pHを中性(7~8付近)に上げた後、トロンビン特異的インヒビターであるヒルジンのC末端12残基からなるペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィー(下記参照)に供した。その後、0~1Mの塩化ナトリウムを含む50mMトリス、pH7.6バッファーを用いて直線的な勾配により溶出し、活性のある画分を集めた。

【0021】ヒルジンC末端領域ペプチド固定化アフィニティークラムの調製

ヒルジンC末端領域のアミノ酸12残基(アミノ酸配列: GDFEEIPEEYLQ)を、ペプチド自動合成装置(Applied Biosystems Peptide Synthesizer)を用いて固相法で合成し、C-18逆相HPLCにて精製し、凍結乾燥した。このペプチド粉末を1mg/mlとなる

8

ように0.2Mリン酸バッファー(pH8.5)にて調整し、あらかじめ蒸留水で洗浄、乾燥したリガンド固定化用アフィニティークロマトグラフィーに、ゲル乾燥重量1グラムあたりペプチド溶液1.5mlに懸濁させ、室温にて一晚振とう反応した。その後、還元剤である水素化ホウ素ナトリウムを7mg/ゲルgで反応させて、さらに一晚振とう反応し、蒸留水にて洗浄後、1Mエタノールアミン/0.2M トリス塩酸バッファー(pH7.8)で一晩振とうした。これを、蒸留水で洗浄後、使用するバッファーにて平衡化した。

#### 【0022】実施例4

##### 精製蛋白質の活性化

精製されたヒトプレトロンビン-2は蛇毒エカリンを用いて以下の行程でαトロンビンへ変換した。終濃度20μg/mlの精製ヒトプレトロンビン-2に、エカリン2単位/mlをバッファー(50mM トリス、0.1%ポリエチレングリコール8000、50mMベンザミジン塩酸塩、100mM塩化ナトリウム、pH8.0)中で室温下、一晚静置した。反応液を前述のヒルジンペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィーに供した。その後、0~1Mの塩化ナトリウムを含む50mM トリスバッファー(pH7.6)を用いて、直線的な勾配により溶出し、活性のある画分を集めた。

#### 【0023】実施例5

(大腸菌由来まき直しヒト遺伝子組換えトロンビンの諸性質)

##### 単一性および分子量

Laemmli(Nature 227: 680-685 (1970))の方法に準じて還元条件下でSDS-PAGEを実施し、クマジーブリリアントブルーで染色した。まき直した遺伝子組換えヒトプレトロンビン-2は、単一のバンドを示した。また、活性化した遺伝子組換えヒトαトロンビンは、活性化に伴って生じたA鎖とB鎖の二つのバンドが確認された。さらに、これらは、ヒトブラズマ由来のαトロンビンのB鎖内に存在するN-グリコシド結合した糖鎖を酵素的に除去したものと同等の移動度を示したことから、ヒトブラズマ由来のαトロンビンとはその分子量において糖鎖の有無の違いを有するのみでポリペプチド鎖においては同等であることが示された。SDS-PAGEにて算出された分子量は、プレトロンビン-2でおよそ36,000、αトロンビンでA鎖4,000、B鎖が32,000であった(図2)。

#### 【0024】酵素活性

エカリンによって活性化した遺伝子組換えヒトαトロンビンを、ヒトブラズマ由来αトロンビン(Haematologic Technologies Inc.より購入)とを以下に示す酵素活性において比較し、同等もしくはそれ以上の活性を有することを確認した(表2)。

【表2】

9

10

$\alpha$ トロンビン (由来)	plasma(HTI)	E.coli
1. kcat, Km for S2238(pH8.0 at 37°C)		
kcat(sec <sup>-1</sup> )	164±15	161±5
Km( $\mu$ M)	6.1±0.4	7.1±0.1
kcat/Km(sec <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	27.2±1.3	22.8±0.4
2. kcat/Km(sec <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> ) for FpA	10.6±0.8	12.5±0.6
3. Kdapp(nM) for GAG-UTM	1.4±0.2	1.1±0.2
4. kcat, Km for protein-C activation with GAG-UTM		
kcat(min <sup>-1</sup> )	97.7±2.8	111.2±6.2
Km( $\mu$ M)	5.9±0.4	6.7±0.5
kcat/Km(min <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	16.7±0.7	16.6±0.2
without GAG-UTM		
kcat(min <sup>-1</sup> )	8.5±0.2	10.3±0.1
Km( $\mu$ M)	16.3±0.3	11.3±0.3
kcat/Km(min <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	0.52±0.02	0.91±0.02
5. second rate constant for inhibition by ATIII		
k(min <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	0.65±0.01	0.62±0.01
6. トロンビン欠乏血漿を用いた凝固時間測定	1.0 とする	1.0
7. 血小板凝集能	1.0 とする	1.0

【0025】1) 合成発色基質(S2238)の切断活性におけるkcat、Kmの測定

プラズマ由来および遺伝子組換え $\alpha$ トロンビンを終濃度0.5nM、種々の濃度の合成発色基質(S2238; 終濃度3から50 $\mu$ M)を添加し、バッファー(50mMトリリス、0.1%ポリエチレングリコール8000、0.01%ヒト血清アルブミン、100mM塩化ナトリウム、pH8.0)中、37°Cで反応させ、405nmの吸光度の変化の初速度を測定し、得られた値からHanes-Woolfプロットにて、S2238に対するkcat、Kmを測定し両者で比較した(表2)。

【0026】2) フィブリノペプチドAの遊離におけるkcat/Kmの測定

プラズマ由来および遺伝子組換え $\alpha$ トロンビンを終濃度0.2nMで、そしてヒト精製フィブリノーゲン340nMをバッファー(50mMリン酸、100mM塩化ナトリウム、0.1%ポリエチレングリコール8000、pH7.5)中37°Cで反応させ、経時的に(1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12分)サンプリングし、終濃度0.3Mの過塩素酸で反応を停止し、0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過後、濾液を逆相C18HPLCクロマトグラフィーにて生じたフィブリノペプチドAを定量し、Ln{([FpA]f-[FpA]t)/([FpA]f-[FpA]0)}を時間に対してプロットし(図3)、最小自乗により当てはめた直線から

得られる傾きを、用いたトロンビン濃度(0.2nM)で除することでフィブリノペプチドAの遊離に対するkcat/Kmを測定した(表2)。

【0027】3) グリコサミノグリカン修飾トロンボモジュリン(GAG-UTM)との見かけの解離定数(Kdapp)の測定

終濃度0.5nMのトロンビン溶液に対して、種々の濃度(終濃度0.8~50nM)のグリコサミノグリカン修飾トロンボモジュリン(GAG-UTM: Edanoら、Int. J. Biochem. Cell Biol., 30:77-88(1988))と基質であるプロテインCを終濃度1 $\mu$ Mで添加してバッファー(50mMトリリス、0.1%ポリエチレングリコール8000、0.01%ヒト血清アルブミン、5mM塩化カルシウム、100mM塩化ナトリウム、pH7.5)中で37°Cで90秒反応させ、その後トロンビン特異的インヒビターであるヒルジンを終濃度5単位/ml添加して、反応を停止させ、生じた活性化プロテインC(APC)の濃度を終濃度1mMの合成発色基質S2366にて定量し、Hanes-Woolfプロットにより、GAG-UTMに対する見かけの解離定数(Kdapp)を測定した(表2)。

【0028】4) プロテインCの活性化におけるkcat、Kmの測定

グリコサミノグリカン修飾トロンボモジュリンの存在

50

11

下、不在下でプロテインCの活性化に対しての $k_{cat}$ 、 $K_m$ を以下に示す方法で測定した。グリコサミノグリカン修飾トロンボモジュリンの存在下では、終濃度0.5 nMの $\alpha$ トロンビンと50 nMのGAG-UTMに対して、種々の濃度(終濃度1.25~2.0  $\mu$ M)のプロテインCをバッファー(5.0 mMトリス、0.1%ポリエチレングリコール8000、0.01%ヒト血清アルブミン、5 mM塩化カルシウム、100 mM塩化ナトリウム、pH 7.5)中で混合し、37°C 90秒反応させて、その後トロンビン特異的インヒビターであるヒルジンを終濃度5単位/ml添加して、反応を停止させ、生じた活性化プロテインC(APC)の濃度を終濃度1 mMの低分子発色基質S2366にて定量し、既知量のAPCを用いた検量線から一分間あたりのAPCの出来高を算出し、これを、Hanes-Woolfプロットに当てはめることにより、 $k_{cat}$ 、 $K_m$ を測定した(図4、表2)。

【0029】グリコサミノグリカン修飾トロンボモジュリンの不在下では、終濃度5 nMの $\alpha$ トロンビンに対して種々の濃度(終濃度1.25~4.0  $\mu$ M)のプロテインCをバッファー(5.0 mMトリス、0.1%ポリエチレングリコール8000、0.01%ヒト血清アルブミン、100 mM塩化ナトリウム、pH 7.5)中で混合し、37°C 15分反応させて、その後トロンビン特異的インヒビターであるヒルジンを終濃度5単位/ml添加して、反応を停止させ、生じた活性化プロテインC(APC)の濃度を終濃度1 mMの低分子発色基質S2366にて定量し、既知量のAPCを用いた検量線から一分間あたりのAPCの出来高を算出し、これを、Hanes-Woolfプロットに当てはめることにより、 $k_{cat}$ 、 $K_m$ を測定した(図4、表2)。

【0030】5) 阻害剤アンチトロンビンIII(ATIII)との反応における二次速度定数の測定  
この測定は、擬一次反応の条件下、ヘパリン不在下で行った。阻害反応は終濃度5 nMの $\alpha$ トロンビンに対して、種々の濃度のアンチトロンビンIII(終濃度100 nM~1.7  $\mu$ M)を添加して、経時的に残存トロンビン量を合成発色基質S2238を終濃度400  $\mu$ M添加することで定量した。各アンチトロンビンIII濃度における経時的な残存活性と時間をプロットしたグラフの傾きから、その濃度における擬一次反応速度定数を算出し(図5a)、続いて、各濃度での求めた擬一次反応速度定数をアンチトロンビンIII濃度に対してプロットしたグラフの傾きから阻害剤アンチトロンビンIIIに対する二次速度定数を決定した(図5b、表2)。

【0031】6) トロンビン欠乏血漿を用いた凝固時間の測定

あらかじめキュベット内で37°Cに加温しておいたヒトトロンビン欠乏血漿100  $\mu$ lに対して、6~18 nMの $\alpha$ トロンビン溶液をバッファー(5.0 mMトリス、0.

12

1%ポリエチレングリコール8000、0.01%ヒト血清アルブミン、100 mM塩化ナトリウム、pH 7.5)で希釈調製したものを200  $\mu$ l添加して、凝固反応を開始させ、フィブリンタイマーで凝固時間を測定した(図6)。凝固時間を $\alpha$ トロンビン濃度に対してプロットしたグラフから、プラズマ由来のものと遺伝子組換え体との活性の相対比較を行った(表2)。

【0032】7) 血小板凝集能の測定

洗浄血小板を健康人全血より調製し、 $1.3 \times 10^8$  血小板/mlとなるよう0.35%ヒト血清アルブミンを含むTyrode'sバッファー(pH 7.3)にて調整し、あらかじめ37°Cに加温したこの血小板浮遊液300  $\mu$ lに対して、種々の濃度に希釈した $\alpha$ トロンビン(6.25~50 nM)100  $\mu$ lを添加し、光の透過率の変化をアグリゴメータにて測定した。ここで、用いた血小板の完全凝集までの時間(光の透過が最大になり、プラトーを示すまでの時間)を定義し、これを $\alpha$ トロンビンの終濃度に対してプロットし(図7)、その直線からプラズマ由来のものと遺伝子組換え体との活性を相対比較した(表2)。

【0033】大腸菌由来まき直しヒト遺伝子組換えトロンビンの諸性質に関する考察

プラズマ由来 $\alpha$ トロンビンと、本法により調製された組換え $\alpha$ トロンビンの酵素学的性状に関して種々のアッセイを行った。具体的には合成低分子発色基質であるS2238の水解活性、高分子天然基質であるフィブリノーゲンの切断活性及びプロテインCの活性化並びにトロンビンのレセプターの一つであるトロンボモジュリンの改変体に対する親和定数の測定、そして、天然の阻害剤であるアンチトロンビンIIIに対する阻害の二次速度定数の測定、さらにはこれら素反応の複合系と想定される凝固時間の測定及び血小板凝集能の測定を行った。その結果、表2に示すごとく、いずれの項目においても両者で有意な差は認められないと判断された。特に天然の基質であるフィブリノーゲンに対するフィブリノペプチドAの遊離活性及びトロンボモジュリン存在下のプロテインCの活性化速度及びアンチトロンビンIIIによる阻害速度定数の比較では、両者の間でその値に良い一致が認められた。さらには、生体内の反応に近い凝固時間の測定及び血小板の凝集能に差がないことから、本方法で調製された $\alpha$ トロンビンは試薬としてのみならず生体内での止血・血栓等の凝固因子製剤として有用であると結論された。

【配列表】SEQUENCE LISTING<110>JURIDICAL FOUNDATION ON THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE<120>Method for preparing yeast-derived recombinant thrombin<130>JP401YS<160>5<210>1<211>30<212>DNA<213>Human<400>1atggcgacg tccgaggctt gcagctgcct<210>2<211>29<212>DNA<213>Human<400>2ctactctcca aactgataca tgaccttct<210>3<211>24<212>DNA<213>Human<400>

50



13

3atgcccattgg ccacaagtga gtac<210>4<211>33<212>DNA<2  
 13>Human<400>4tagcataagc ttctactctc caaactgac aat  
 <210>5<211>12<212>PRT<213>Human<400>5Gly Asp Phe G  
 lu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトプロトロンビン-2の発現プラスミドの構築を示す。

【図2】本願発明で得られた組換えヒトプロトロンビンのSDS-PAGEの泳動図を示す。

【図3】本願発明で得られた組換えヒトプロトロンビンのフ

ィブリノペプチドAリリースアッセイの結果を示す。

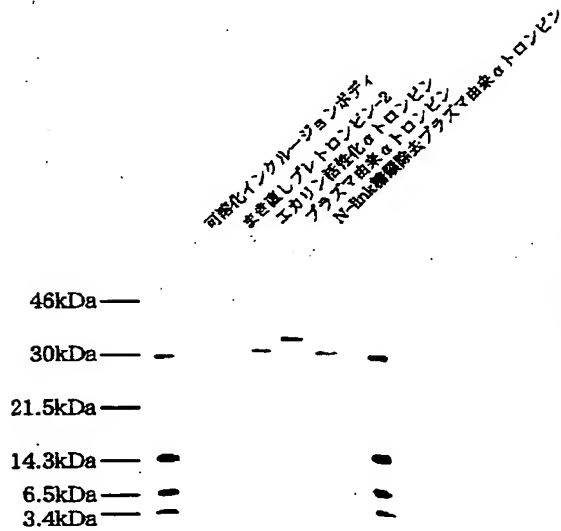
【図4】本願発明で得られた組換えヒトプロトロンビンのプロテインCの活性化能の測定結果を示す。

【図5】本願発明で得られた組換えヒトプロトロンビンの阻害剤アンチトロンビンIII (ATIII) との反応における二次速度定数の測定結果を示す。

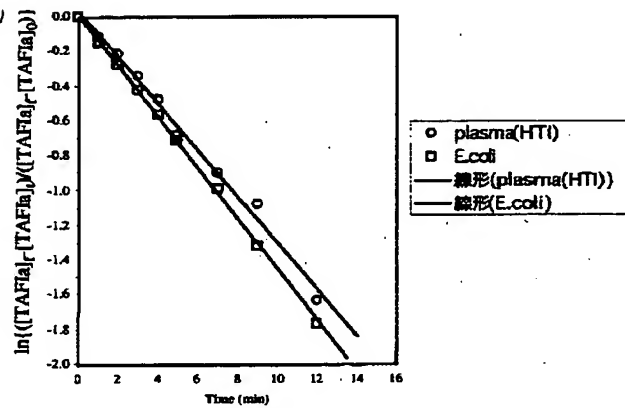
【図6】本願発明で得られた組換えヒトプロトロンビンのトロンビン欠乏血漿を用いた凝固時間の測定結果を示す。

【図7】本願発明で得られた組換えヒトプロトロンビンの血小板凝集能の測定結果を示す。

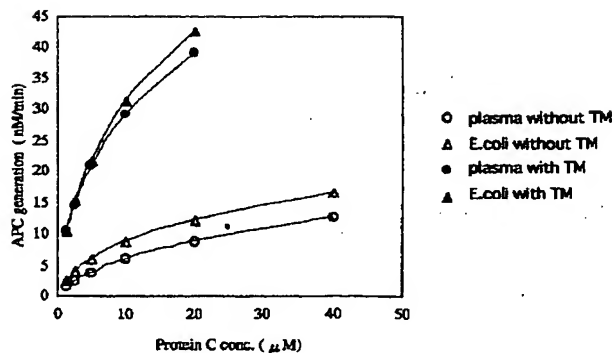
【図2】



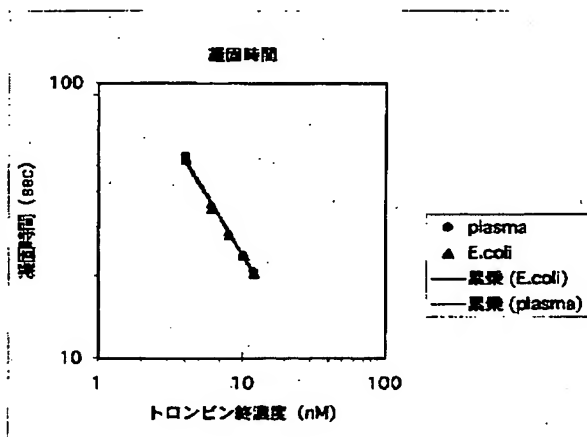
【図3】



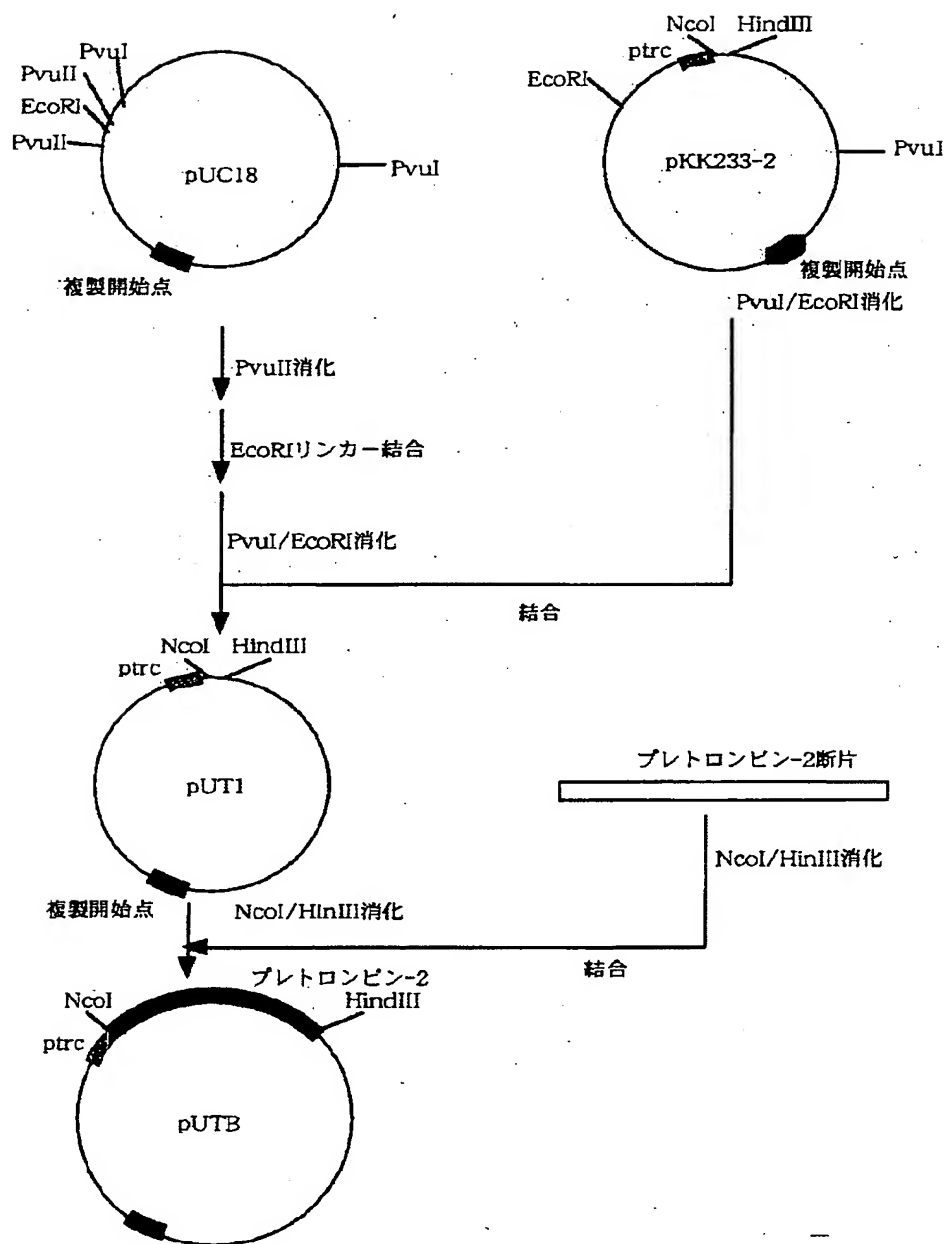
【図4】



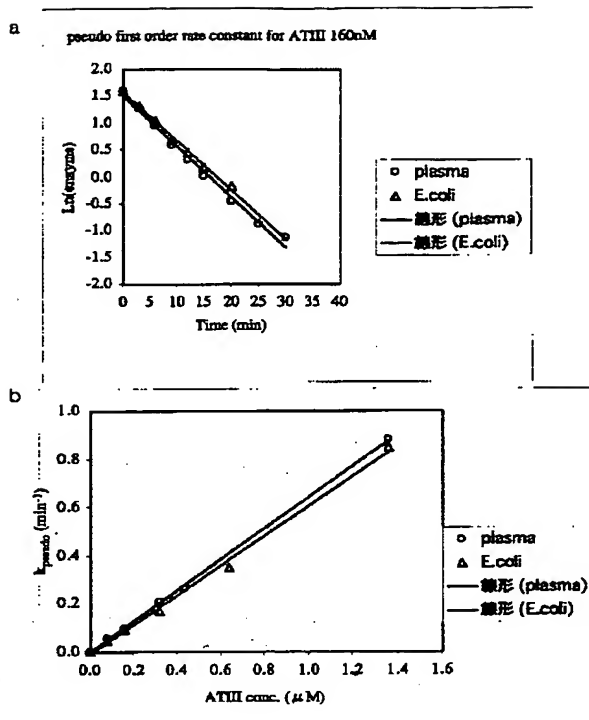
【図6】



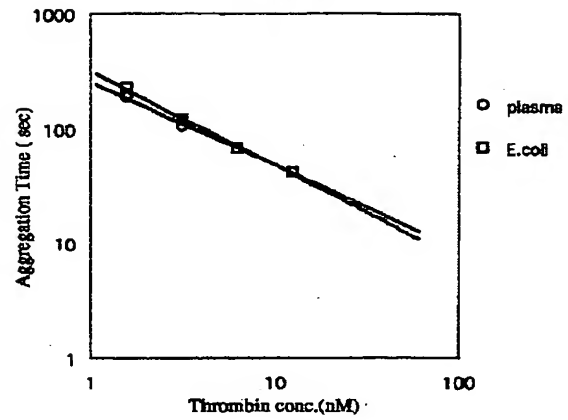
【図 1】



【図5】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 中武 博  
 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1  
 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研  
 究所内  
 (72)発明者 今村 隆幸  
 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1  
 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研  
 究所内

30 (72)発明者 野崎 周英  
 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1  
 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研  
 究所内  
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA14 CA04 DA06 EA04  
 GA11 HA01  
 4B050 CC03 DD11 FF01C FF02C  
 LL01  
 4B065 AA26X AA93Y AA99Y AB01  
 AC14 BA02 BD03 CA33